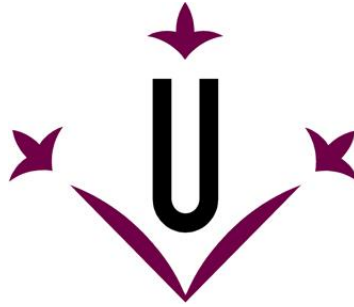


UNIVERSITAT DE LLEIDA

FACULTAT DE MEDICINA

Grau en Nutrició Humana i Dietètica



Avaluació de la ingesta mantinguda de suc de magrana fresc sobre la producció d'àcids grassos de cadena curta i productes del metabolisme del colesterol i àcids biliars en mostres de femta

Autora:

Laura Biosca Larios

Tutora:

M^a José Motilva Casado

Co-Tutora:

Juana Inés Mosele

Lleida, 2014

Avaluació de la ingesta mantinguda de suc de magrana fresc sobre la producció d'àcids grassos de cadena curta i productes del metabolisme del colesterol i àcids biliars en mostres de femta

Treball final de Grau presentat per:

Laura Biosca Larios

Tutoritzat per:

M^a José Motilva Casado

Co-Tutoritzat per:

Juana Inés Mosele

ÍNDEX

Resum	4
Resumen	5
Abstract	6
1. Antecedents	7
2. Justificació de l'estudi	12
3. Material i mètodes	13
3.1. Elaboració del suc de magrana	13
3.2. Descripció de l'estudi	14
3.3. Recollida de mostres	15
3.4. Anàlisi d'àcids grassos de cadena curta	15
3.5. Anàlisi d'esterols i d'àcids biliars	16
3.6. Anàlisi estadístic	17
4. Resultats	18
5. Discussió	21
6. Conclusions	24
7. Bibliografia	26

RESUM

La magrana és una fruita que conté una elevada varietat de components bioactius que són de gran interès terapèutic. Aquest estudi busca determinar si després de la ingesta de suc de magrana, hi ha una modificació en la producció d'àcids grassos de cadena curta (AGCC), d'esterols i d'àcids biliars, els quals juguen un paper important en la incidència de malalties cròniques. Deu subjectes sans (quatre homes i sis dones de 26-41 anys) van participar en l'estudi, que va consistir en la ingesta de 200 mL/dia de suc de magrana durant 28 dies. La femta dels voluntaris es va recollir abans i després de la intervenció, i es van determinar les concentracions dels AGCC, esterols i àcids biliars mitjançant cromatografia de gasos-FID. Després de l'anàlisi dels resultats, s'ha detectat un increment significatiu ($p < 0.05$) de la quantitat de colesterol excretat en la femta dels voluntaris al terme de la investigació amb suc de magrana. Però, tot i que s'han observat canvis en les concentracions d'AGCC (àcid acètic, àcid propiònic i àcid butíric), d'esterols (coprostanol i colestanol) i d'àcids biliars (àcid còlic, àcid desoxicòlic, àcid litocòlic i àcid quenodesoxicòlic), aquests no són estadísticament significatius.

RESUMEN

La granada es una fruta que contiene una elevada variedad de compuestos bioactivos de gran interés terapéutico. Este estudio busca determinar si después de la ingesta de zumo de granada, existe una modificación en la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), esteroides y ácidos biliares, los cuales juegan un papel importante en la incidencia de enfermedades crónicas. Diez sujetos sanos (cuatro hombres y seis mujeres de 26-41 años) participaron en el estudio, que consistió en la ingesta de 200 mL/día de zumo de granada durante 28 días. Las heces de los voluntarios se recogieron antes y después de la intervención, y se determinaron las concentraciones de los AGCC, esteroides y de ácidos biliares mediante cromatografía de gases-FID. Tras el análisis de los resultados, se ha detectado un incremento significativo ($p < 0.05$) de la cantidad de colesterol excretado en las heces de los voluntarios al término de la intervención con zumo de granada. Sin embargo, a pesar de que se han observado cambios en las concentraciones de los AGCC (ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico), esteroides (coprostanol y colestanol) y ácidos biliares (ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido litocólico y ácido quenodesoxicólico), éstos no son estadísticamente significativos.

ABSTRACT

The pomegranate it is a fruit that contains a high variety of bioactive compounds that are of great therapeutic interest. The propose of this study was to determinate if after the ingestion pomegranate juice there is a modification in the production of short chain fatty acids (SCFA), sterols and bile acids, which play and important role in the incidence of chronic diseases. Ten healthy subjects participated in the study (four men and six women of 26-41 years old), who ingested 200 mL/day of pomegranate juice during 28 days. Fecal samples of each volunteer were obtained before and after the intervention. Fecal concentration of SCFA, sterols and bile acids were analyzed by GC-FID. Results have shown a significant increase in the concentration of cholesterol ($p < 0.05$) in feces after 28 days of dairy intake of pomegranate juice. Therefore, despite we have noticed changes in the concentration of SCFA (acetic acid, propionic acid and butyric acid), sterols (coprostanol, and colestanol) and bile acids (cholic acid, deoxycolic acid, lithocholic acid, chenodeoxycholic acid) these are not statistically significant.

1. ANTECEDENTS

Molts estudis demostren que el consum de fruites i vegetals tenen un paper important en la prevenció de malalties cardiovasculars, càncer i malalties degeneratives, degut a l'elevada presència de fitoquímics en la seva composició. La magrana en especial, és una fruita que s'està estudiant molt, ja que conté una gran varietat de components bioactius que aporten beneficis per la salut.

La magrana és originària d'Àsia i de la regió mediterrània i forma part de la família Punicaceae. Existeixen dues espècies, la *Punica protopunica* i la *punica granatum*, essent només la segona comestible (Gorena et al. 1983).

Aquesta fruita presenta en totes les parts de la planta (fruita, fulles, llavors, pericarpi, escorça i arrel) molts components fenòlics, destacant un elevat contingut d'àcid el·làgic, tanins hidrolitzables i antocianines (**Figura 1**). A més, també s'hi poden trobar altres fitoquímics com àcids fenòlics, alcaloides, triterpenoides, esterols, àcids grassos i triglicèrids (Seeram et al. 2006).

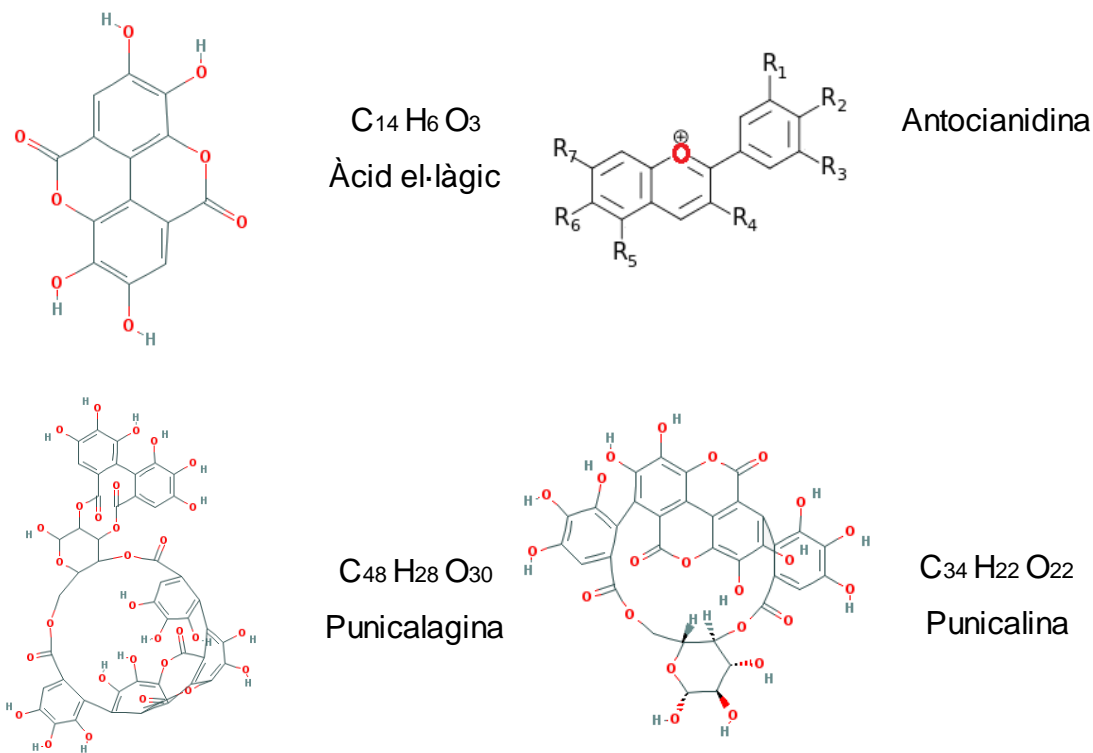


Figura 1. Estructura química de l'àcid el·làgic, l'antocianidina i dels tanins hidrolitzables (punicalagina i punicalina).

S'ha vist que els polifenols presents en la magrana podrien comportar una modificació en el perfil dels àcids grassos de cadena curta (AGCC), esterols i àcids biliars. Els components responsables d'aquests efectes són, sobretot, l'àcid el·làgic i els tanins hidrolitzables (o el·lagitanins) (**Figura 1**), ja que s'ha observat que són escassament absorbits a l'intestí prim i arriben a l'intestí gros on són capaços d'interactuar amb la microbiota local. Alguns estudis com el portat a terme per Bialonska et al. (2010), han observat que comporten un augment del creixement de lactobacillus i bifidobacteris, bacteris que habiten en el tracte gastrointestinal dels éssers humans i que participen en la producció d'AGCC.

Els AGCC són àcids carboxílics de 1 a 6 àtoms de carboni que es produeixen a l'intestí gros per la fermentació bacteriana d'hidrats de carboni, i en menor proporció, de proteïnes (**Figura 2**). El perfil quantitatiu i qualitatiu d'AGCC dependrà de les característiques de la flora bacteriana, el pH, el temps de trànsit intestinal i els nutrients disponibles. Un elevat percentatge (80-90%) s'absorbeix al còlon i la resta s'excreta per la femta (Huda-Faujan et al. 2010).

Els AGCC majoritaris són l'àcid acètic, l'àcid propiònic i l'àcid butíric que s'obtenen mitjançant la fermentació dels hidrats de carboni. La presència d'aquests metabòlits microbians afavoreixen l'absorció de sodi i líquids, nodreixen les cèl·lules de la mucosa, contribueixen a la salut de la mucosa colònica mantenint les seves funcions (Scheppach. 1994), estimulen el flux sanguini i disminueixen el pH luminal, comportant una disminució de la formació secundària d'àcids biliars al còlon (Henningsson et al. 2001).

A més, l'àcid butíric és una important font d'energia per als colonocits i té un paper clau en la proliferació, la diferenciació i l'apoptosi d'aquests (Cuff et al. 2001), per tant, participa en la prevenció i el tractament de malalties de la mucosa del còlon i pot afavorir l'adaptació de l'intestí davant de reseccions intestinals o colòniques (Scheppach. 1994).

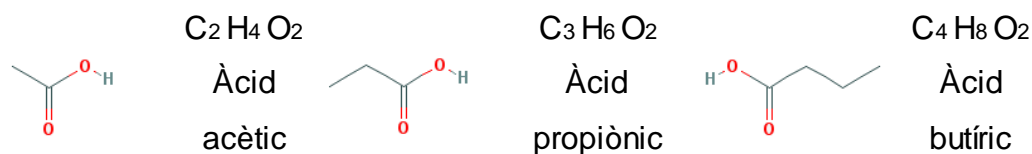


Figura 2. Estructura química dels àcids grassos de cadena curta (AGCC).

Els esterols són substàncies derivades del ciclopentanoperhidrofenantrè (Martínez. 2002). El colesterol (**Figura 3**) és l'esterol més abundant d'origen animal i és un element fonamental per al manteniment i l'estructura de les membranes cel·lulars, a més, és precursor d'hormones esteroides, vitamina D i sals biliars (Voet et al. 2006). Existeixen dos fonts que proveeixen a l'organisme de colesterol: la síntesi endògena i l'aport a través de la dieta.

Es sap que un excés de colesterol constitueix un factor de risc per el desenvolupament de malalties cardiovasculars. Un dels sistemes amb que compta l'organisme per a l'eliminació de colesterol, i així aconseguir un balanç més equilibrat, és mitjançant l'excreció de bilis a l'intestí. A més a més, una disminució de l'absorció de colesterol aportat per els aliments de la dieta també sembla evitar la presència en excés d'aquest esteroi en l'organisme. Part del colesterol entèric s'elimina com a tal en la femta i l'altra part s'elimina com a producte del metabolisme de la microbiota local, ja que es converteix en coprostanol i colestanol per acció dels microorganismes de l'intestí (Melo i Cuamatzi. 2007) (**Figura 3**). El coprostanol s'ha relacionat amb la formació de tumors intestinals (Panda et al. 1999; Mastromarino et al. 1976), el colestanol en canvi, sembla que conjugat amb sucres, podria tenir una aplicació clínica en la prevenció i el tractament de càncer (Faried et al. 2006)

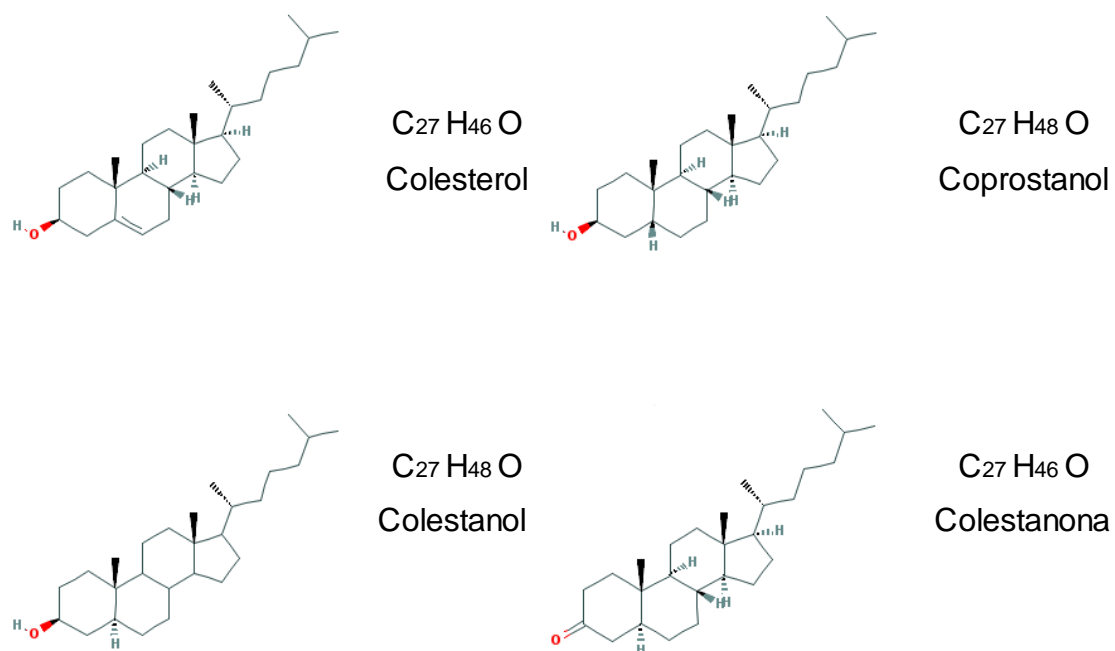


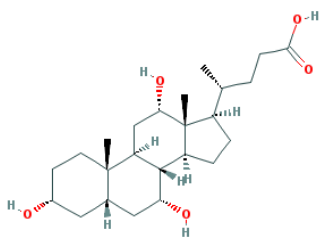
Figura 3. Estructura química dels esterols.

Els àcids biliars són els productes finals del colesterol i per tant són la forma en que s'elimina més colesterol.

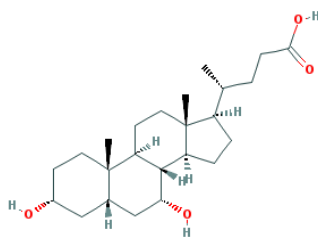
Els àcids biliars primaris més abundants són l'àcid còlic i l'àcid quenodesoxicòlic que normalment es troben conjugats amb glicina o taurina (**Figura 4**) i es sintetitzen als hepatòcits del fetge a partir de l'àcid colànic. Aquests s'encarreguen d'eliminar l'excés de colesterol, participen en la prevenció de la precipitació de colesterol en la vesícula biliar, faciliten l'absorció intestinal de lípids i vitamines liposolubles i participen en l'eliminació i la recirculació de drogues i toxines.

A l'intestí prim i, majoritàriament a l'intestí gros, els àcids biliars primaris són transformats per microorganismes en àcids biliars secundaris al patir desconjugacions i dehidroxilacions, aquests són l'àcid desoxicòlic i l'àcid litocòlic (Lucarelli. 2010).

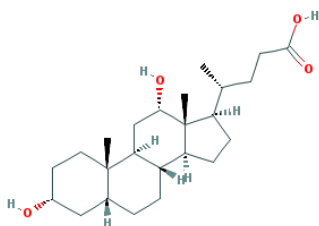
Elevades concentracions d'aquests àcids biliars secundaris en femta, sang i bilis, s'han relacionat amb càlculs biliars de colesterol, malalties gastrointestinals (Ridlon et al. 2006) i càncer de còlon (Mastromarino et al. 1976).



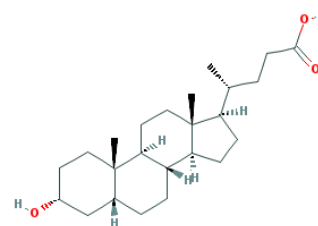
$C_{24}H_{40}O_5$
Àcid còlic



$C_{24}H_{40}O_4$
Àcid
quenodesoxicòlic



$C_{24}H_{40}O_4$
Àcid
desoxicòlic



$C_{24}H_{40}O_3$
Àcid litocòlic

Figura 4. Estructura química dels àcids biliars primaris i dels àcids biliars secundaris.

2. JUSTIFICACIÓ DE L'ESTUDI

Actualment hi ha una elevada prevalença de malalties cròniques que va augmentant amb el temps. L'anàlisi de metabòlits i d'altres components en femta és una eina de diagnosi no invasiva que podria ajudar a predir potencials marcadors de l'estat de salut i malalties dels individus. És per això, que aquest estudi pretén determinar si la complementació amb suc de magrana permet aconseguir, per la presència de components bioactius en la seva composició, una modificació de les concentracions fecals d'AGCC, d'esterols i d'àcids biliars, de tal manera que aquests canvis es relacionin amb avantatges associats a la salut humana.

L'objectiu general de l'estudi és veure diferències en les concentracions de diferents molècules de les mostres fecals dels participants, abans i després de la ingesta de 200 mL de suc de magrana mantinguda durant 28 dies.

Com a objectius específics:

- Determinar si la intervenció comporta un increment en les concentracions d'àcid acètic, àcid propiònic i àcid butíric en les mostres fecals.
- Examinar si el consum mantingut de suc de magrana provoca canvis en les concentracions d'esterols en femta.
- Comprovar si hi ha un increment en les concentracions dels àcids biliars primaris i una disminució en les concentracions dels àcids biliars secundaris en les mostres fecals, després de la ingesta de suc de magrana.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1. Elaboració del suc de magrana.

El suc es va elaborar manualment en la planta pilot de ETSEA (Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària) de Lleida, a partir de magranes fresques comprades en un mercat local. El mateix dia que es van adquirir, es van treure els fruits del còrtex i es van barrejar per tal d'obtenir el suc.

Immediatament després de fer el suc, aquest es va dividir en dosis de 200 mL i es va guardar en ampolles negres per evitar el deteriorament dels components fenòlics, a -20°C.

Per tal d'analitzar el suc de magrana, 1 mL d'aquest es va centrifugar a 5000 rpm durant 10 min a 4°C, es va filtrar el sobrenedant i es va analitzar mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució acoblada a espectrofotometria de masses en tàndem (UPLC-MS/MS) per tal de determinar la composició fenòlica, que es detalla en la **Taula 1**.

Components	MITJA (mg / L)
<i>Àcids fenòlics</i>	53,23
<i>Flavonoids</i>	17,82
<i>Llignans</i>	20,71
<i>Àcid el·làgic lliure i conjugat</i>	1280,92
<i>El·lagitanins</i>	
<i>Punicalagina</i>	348,07
<i>Puniocalina</i>	100,74
<i>Altres el·lagitanins</i>	1317,81
<i>Total El·lagitanins</i>	1766,62
<i>Antocians</i>	212,35
TOTAL	3351,65

Taula 1. Composició fenòlica del suc de magrana.

3.2. Descripció de l'estudi

En l'estudi es van presentar 15 voluntaris, però al realitzar l'entrevista es van descartar tres d'ells, ja que dos presentaven alteracions intestinals i l'altre estava prenent antibiòtics.

Així doncs, finalment 12 subjectes sans (4 homes i 8 dones de 26-41 anys) van començar participant en l'estudi. En l'entrevista van declarar que almenys en els últims tres mesos no havien pres antibiòtics, no havien patit malalties intestinals i que a l'inici de l'estudi presentaven bona salut. Durant la intervenció, dos dels participants que estaven en l'estudi van haver de prendre antibiòtics, això va comportar que finalment 10 subjectes (4 homes i 6 dones) completessin amb èxit l'estudi.

Els participants van rebre explicacions detallades sobre els objectius de l'estudi i les instruccions adequades pel que fa a la ingesta diària del suc de magrana i a la recollida de les mostres fecals.

Els individus van prendre durant 28 dies, 200 mL/dia de suc de magrana. Nou individus procedien del Departament de Ciències Alimentàries de la Universitat de Lleida i els altres tres van ser participants externs. El primer grup, va rebre de dilluns a divendres la dosi diària de suc de magrana, mentre que les dosis per al cap de setmana se les emportaven congelades cada divendres. Pel que fa als tres voluntaris externs, tots ells van rebre les dosis de producte diàries (també congelades) dues vegades a la setmana, aquests havien de mantenir el suc de magrana a casa en congelació i ho descongelaven el mateix dia del seu consum.

La dieta dels participants no es va modificar perquè es volia detectar el perfil metabòlic de l'intestí en una dieta convencional complementada amb 200 mL/dia de suc de magrana.

3.3. Recollida de mostres

La recollida de la femta va realitzar-se durant els tres dies anteriors a l'inici de l'estudi i després dels 28 dies de la ingesta diària de 200 mL de suc de magrana. Les mostres es van recollir en recipients estèrils i immediatament es van liofilitzar i es van conservar a -80°C fins el moment del seu anàlisi.

3.4. Anàlisi d'àcids grassos de cadena curta

Les corbes de calibratge es van realitzar amb solucions estàndard en 8 nivells de concentracions conegudes d'àcid acètic, àcid propiònic i àcid butíric, tots tres adquirits de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). A partir d'aquestes corbes, es van calcular les concentracions d'AGCC en totes les mostres, d'acord amb l'àrea del pic mitjançant l'estandardització interna.

Es van pesar 0,1g d'excrements liofilitzats de cada individu obtinguts abans i després de la ingesta de suc de magrana, realitzant dos rèpliques de cada mostra. A continuació, cada mostra es va barrejar amb 1 mL de solució aquosa acidificada (àcid fosfòric 1%) contenint 4- metil valèric (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) com a patró intern. La concentració final va ser de 500 µg/mL per a l'anàlisi d'AGCC.

Les mostres van ser agitadaes durant 15 minuts i es van centrifugar (10 min, 3000 rpm, 4°C). El sobrenedant resultant es va sotmetre a una segona centrifugació (4 min, 9000 rpm, 4°C). La fase aquosa obtinguda es va filtrar a través d'una xeringa amb un filtre (0,22 µm de mida de porus) i es va transferir a vials de cromatografia.

L'anàlisi d'àcid acètic, àcid propiònic i àcid butíric es va realitzar per cromatografia de gasos (Agilent 7890A Sèrie) utilitzant una columna capil·lar BP-21 (30 m, 0,25 mm, 0,25 d) (SGE, Cromlab SL, Barcelona, Espanya), acoblat a un detector d'ionització de flama (FID). La temperatura de la columna es va programar a 90°C amb un augment de 15°C/min fins a arribar a 150°C, després va augmentar 5°C/min fins a arribar a 170°C i finalment va incrementar-se 20°C/min fins arribar a 240°C, en aquest punt es va mantenir 3

minuts. El temps d'execució total va ser de 14,5 minuts. L'heli va ser el gas portador (flux 1 mL/min) i la injecció es va dur a terme amb un injector de divisió (1:20) a 220°C, la temperatura del detector era de 250°C i es va injectar 1 µL de la solució en el sistema GC-FID. La identificació dels AGCC es va realitzar d'acord amb el temps de retenció dels components estàndard i la seva quantificació es va determinar amb la banda de pic del patró intern com a referència.

3.5. Anàlisi d'esterols i d'àcids biliars

Els patrons d'esterols: colesterol, colestanol, colestanone, coprostanol i 5 α -colestane (patró intern) van esser tots adquirits en sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Els patrons dels àcids biliars: àcid còlic, àcid desoxicòlic, àcid quenodesoxicòlic, i 5 β – àcid colànic (patró intern) van esser adquirits en Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), mentre que l'àcid litocòlic es va obtenir de Acros organics (New Jersey, USA).

Per a l'elaboració dels patrons es va procedir de la mateixa manera que en el cas dels AGCC. En aquest cas tots els patrons es van dissoldre en cloroform i es van preparar dos barreges, una amb tots els patrons dels àcids biliars (incloent 5 β – àcid colànic), quedant amb una concentració final de 200 µL/mL i l'altra amb els patrons d'esterols (incloent 5 α -colestane), quedant una concentració final de 500 µL/mL, en aquest cas, també es van realitzar diferents concentracions per l'elaboració de les rectes de calibratge. Abans de l'anàlisi cromatogràfic, 100 µL de cadascun dels patrons es van evaporar sota corrent de nitrogen i quan es van assecar, s'hi va afegir una barreja amb 50 µL de N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) i 50 µL de piridina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). A continuació es van mantenir els patrons a 60°C durant 30 minuts per obtenir els silil derivats dels components d'interès. Passat aquest temps es van introduir en vials de cromatografia i es van analitzar.

La determinació d'àcids biliars i d'esterols en femta es va fer de forma simultània. Es van pesar 0,01g de femta liofilitzada (contenint 200 µg/mL de

patró intern dels àcids biliars i 500 µg/mL de patró intern dels esterols) i s'hi va afegir 200µL d'una solució de piridina i MSTFA amb una relació 50/50 (v/v) amb la finalitat d'obtenir els derivats sililats dels components d'interès. En aquest cas també es van realitzar dos rèpliques de cada mostra.

Les mostres es van mantenir a 60°C durant 30 minuts, seguidament es van centrifugar (10 min, 9000 rpm, temperatura ambient), després es va recollir el sobrenedant i finalment el sobrenedant de cada mostra es va introduir en vials de cromatografia per al seu posterior anàlisi.

Per a la identificació i quantificació d'esterols i d'àcids biliars es va utilitzar un sistema de cromatografia de gasos (Agilent 7890A, USA) acoblat a un detector d'ionització de flama (FID). Per a la separació dels components es va utilitzar una columna capil·lar DB-1 (30 m x 0.25 mm x 0.25 d) (Agilent, USA). El temps de duració de l'anàlisi va ser de 16,1 minuts sota les següents condicions de temperatura i temps: la temperatura inicial de la columna es va programar a 240°C i es va mantenir durant 1 minut, seguidament la temperatura va augmentar 20°C/min fins arribar als 290°C, després de 2 minuts de manteniment de les condicions anteriors, la temperatura va augmentar 1°C/min fins arribar als 295°C i finalment, la temperatura de la columna va incrementar-se fins a 310°C (25°C/min) i es va mantenir durant 5 minuts. La temperatura del injector va ser de 280°C, el volum d'injecció de la mostra va ser de 1 µL i l'heli va ser el gas d'arrossegament (flux 0.4 mL/min). La temperatura del forn va ser de 325°C mentre que la del detector (FID) va ser de 200°C.

3.6. Anàlisi estadístic

Les mostres van ser analitzades per duplicat i les dades es presenten com a valors mitjans ± desviació estàndard. Les diferències en les concentracions d'AGCC, d'esterols i d'àcids biliars en mostres fecals humanes entre el dia 0 (abans de la ingesta de suc de magrana) i el dia 28 (després de la ingesta de suc de magrana) van ser analitzades per ANOVA, utilitzant STAT-Graphics Plus 5.1. El nivell de significació va ser $p \leq 0,05$.

4. RESULTATS

Els resultats que es presenten a continuació han estat obtinguts a partir del càlcul del valor mig \pm la desviació estàndard de la concentració d'AGCC (àcids acètic, propiònic i butíric), d'esterols (colesterol, coprostanol, colestanol i colestanona) i d'àcids biliars (àcids còlic, desoxicòlic, quenodesoxicòlic i litocòlic) en els excrements donats abans i després d'una ingesta mantinguda (200 mL/dia) de suc de magrana durant 28 dies.

Els resultats de l'anàlisi cromatogràfic d'AGCC en femta es representa en la **Figura 5**. Tot i que la quantitat total i individual de cada component ha patit un lleuger augment, cap d'ells ha resultat significatiu respecte als valors inicials en les mostres de femta donades abans de l'inici de la intervenció amb suc de magrana.

L'àcid acètic és el que presenta un augment més pronunciat, augmentant 1,175 mg/g de femta liofilitzada, l'àcid butíric té un augment més lleuger, ja que la mitja ha augmentat 0,639 mg/g de femta liofilitzada, mentre que l'àcid propiònic presenta un augment gairebé nul, augmentant 0,007 mg/g de femta liofilitzada.

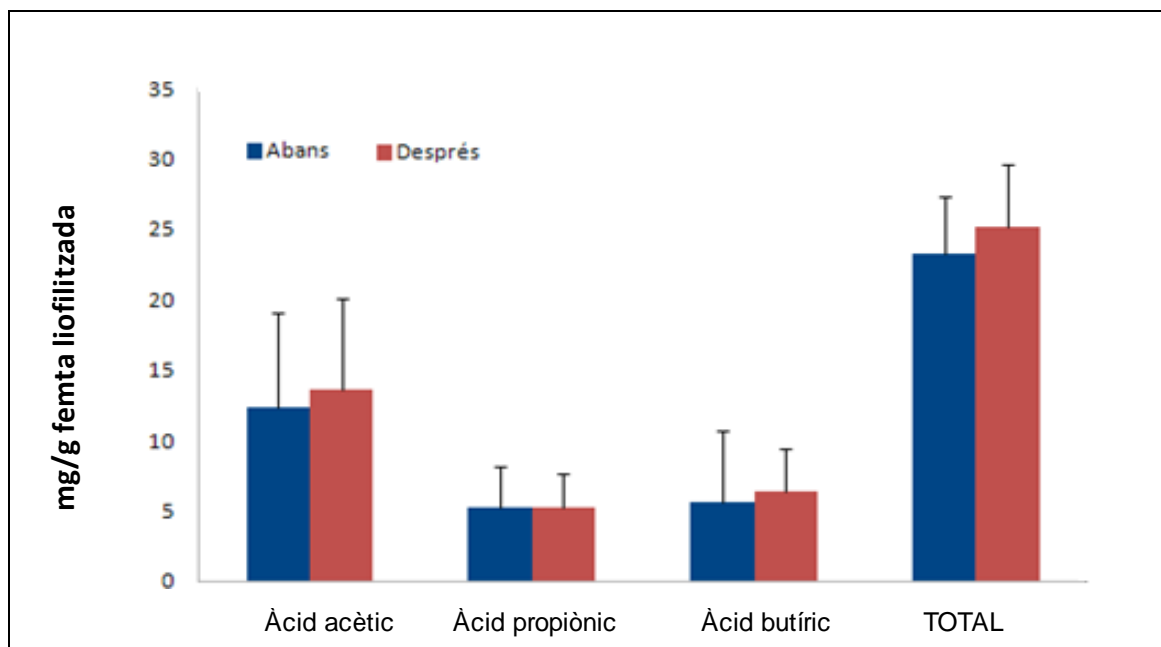


Figura 5. Mitjanes dels valors (n=10) de les concentracions d'àcids grassos de cadena curta (AGCC) abans i després de la ingesta de 200 ml/dia de suc de magrana.

Les concentracions de colesterol, colestanol, colestanona i coprostanol obtingudes a partir de les mitjanes dels valors (n=10), així com el valor total dels esterols en femta, es representen en la **Figura 6**. La quantitat total d'esterols lliures excretats en la femta, ha patit un augment casi imperceptible després de la intervenció amb suc de magrana. L'esterol més abundant en la femta és el coprostanol, i va seguit del colesterol. El colestanol està present en molt poca quantitat, mentre que la colestanona no ha estat detectada en cap de les mostres analitzades. Com es pot observar, el canvi més rellevant detectat ha estat l'augment significatiu ($p<0.05$) de la concentració de colesterol en femta després de 28 dies d'ingesta continuada de 200 mL/dia de suc de magrana. Per altra banda, hi ha una lleugera disminució de colestanol i una disminució més marcada de coprostanol, però aquestes disminucions no són estadísticament significatives.

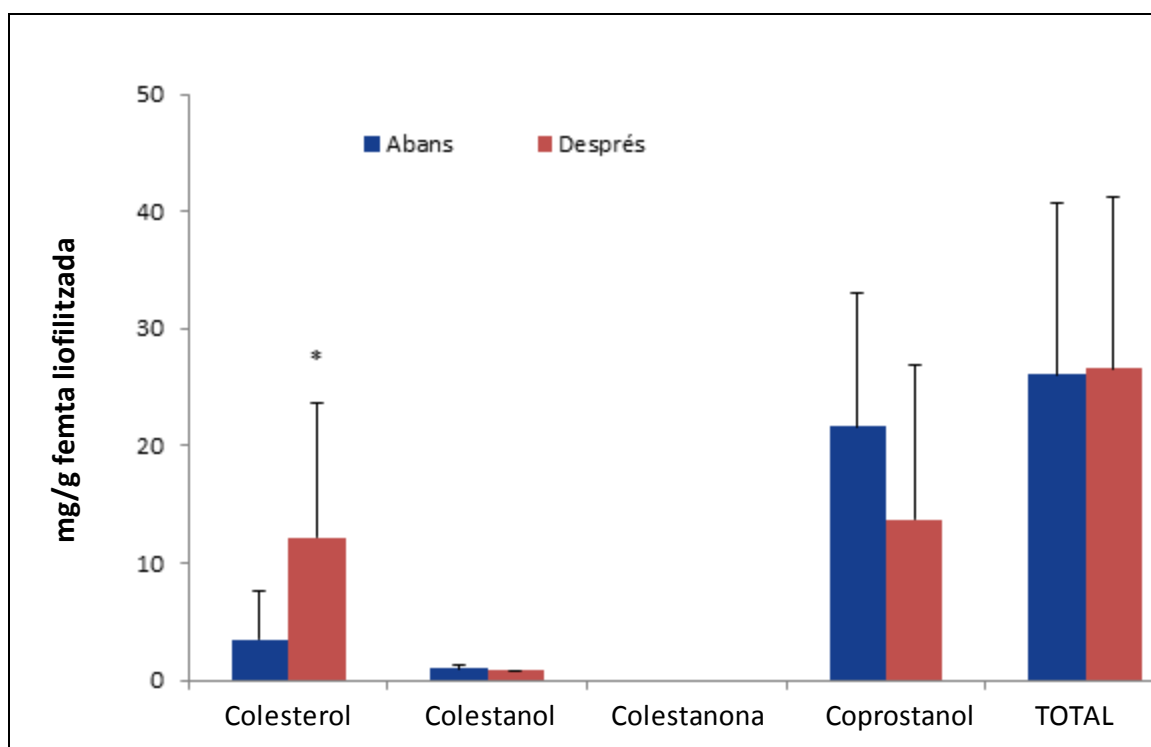


Figura 6. Mitjanes dels valors (n=10) de les concentracions d'esterols abans i després de la ingesta de 200 ml/dia de suc de magrana. (*) Representa els valors que han resultat significatius després del consum de suc de magrana.

Els resultats obtinguts a partir de les mitjanes dels valors (n=10) de la concentració d'àcids biliars (**Figura 7**), mostren un augment en la concentració d'àcid còlic i àcid quenodesoxicòlic i una disminució en la concentració d'àcid litocòlic, d'àcid desoxicòlic i del total d'àcids biliars després de l'ingesta de suc de magrana, però no es denoten canvis significatius.

Tot i això, l'àcid desoxicòlic és l'àcid biliar més predominant en la femta seguit de l'àcid litocòlic i l'àcid còlic, finalment l'àcid que es troba en menys concentració és l'àcid quenodesoxicòlic, el qual amb la ingesta de suc de magrana s'ha incrementat més del doble de la concentració inicial.

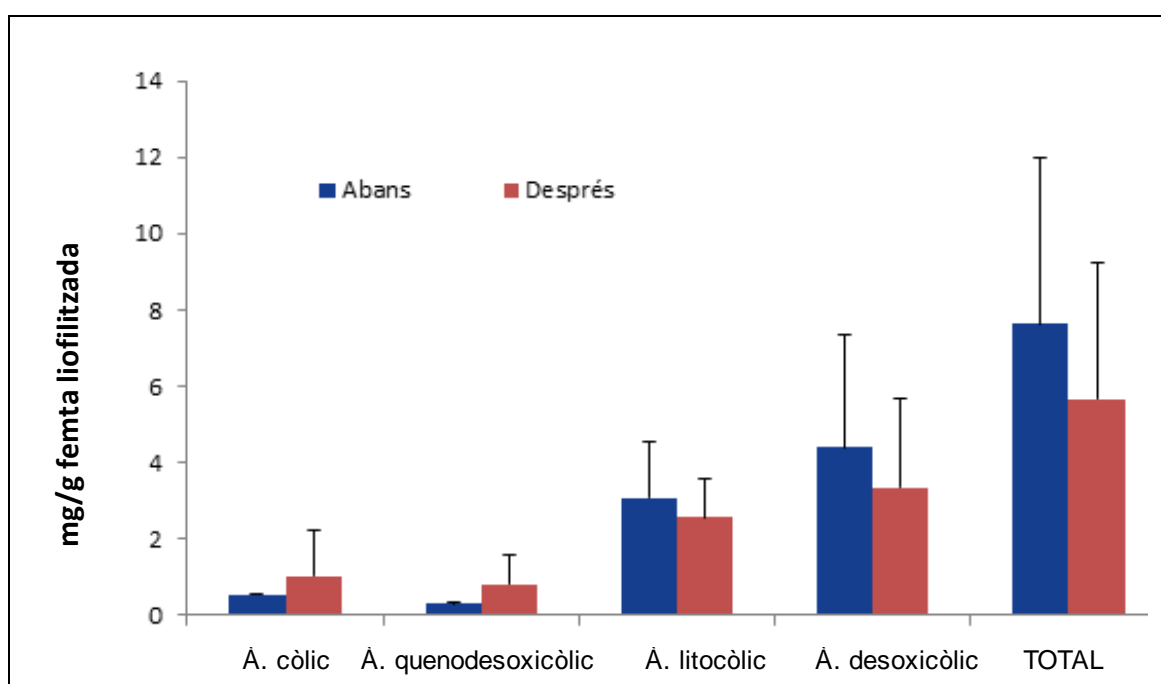


Figura 7. Mitjanes dels valors (n=10) de les concentracions d'àcids biliars abans i després de la ingesta de 200 ml/dia de suc de magrana.

Al comparar les concentracions dels AGCC, esterols i àcids biliars entre les mostres de femta dels individus que han participat en l'estudi, s'observa molta variabilitat, tant en la quantitat de cada component com en les modificacions que es produeixen després de la intervenció (dades no mostrades).

5. DISCUSSIÓ

Amb la finalitat de determinar si complementar la dieta amb suc de magrana podria modificar les concentracions d'AGCC, d'esterols i d'àcids biliars en femta, deu voluntaris sans van participar en el present estudi que va consistir en la ingesta diària de 200 mL/dia de suc de magrana durant un període ininterromput de 28 dies.

El suc de magrana utilitzat a l'estudi presentava més quantitat de components fenòlics que altres sucs de magrana naturals produïts a partir d'arils frescos i d'arils congelats, sucs comercials de magrana (Gil et al. 2000) i moltes fruites i vegetals de consum habitual a Espanya (Proteggente et al. 2002). Aquest fet indica que els participants en l'estudi, en base a les dades presentades en la **Taula 1**, van augmentar la ingesta de components fenòlics en una mitja de 670 mg/dia.

L'increment en els valors obtinguts a partir de les mitjanes del contingut d'AGCC, podria explicar-se per l'efecte que poden tenir els components fenòlics sobre el creixement de lactobacillus i bifidobacteris, que participen en la producció dels AGCC (Bialonska et al. 2010). Tot i aquest increment, els resultats obtinguts no són estadísticament significatius, coincidint amb altres estudis realitzats amb altres fruites i vegetals (Mitsou et al. 2011; Schnäbele et al. 2008).

L'increment d'àcid acètic major que l'àcid butíric pot ser a causa de que l'àcid butíric, al ser una important font d'energia per als colonocits, és captat més ràpidament per aquests i això comporta que trobem una menor quantitat d'aquest en la femta (Haenen et al. 2013).

No s'han trobat estudis en que s'analitzi canvis en la concentració de colestanol a causa d'intervencions amb fenols, però si s'ha trobat un estudi dut a terme per Aprikian et al. (2003) en que s'administra poma liofilitzada al 10% a rates, i s'observa com en l'actual estudi, una disminució de coprostanol i un increment de colesterol, tot i que els seus resultats no són estadísticament significatius.

Els components fenòlics presents en el suc de magrana possiblement han disminuït l'activitat de la lipasa pancreàtica, comportant una disminució de l'absorció de colesterol que s'ha vist amb l'increment d'aquest en femta després de la intervenció (Sugiyama et al. 2007). En un estudi dut a terme per Osada et al. (2006) en que es va suplementar la dieta de rates amb diferents concentracions de polifenols de poma, es pot observar que a major administració de polifenols, major és l'excreció de colesterol en femta. S'ha de tenir en compte que una major excreció de colesterol via femta, pot influir en la concentració plasmàtica de colesterol.

L'augment de l'excreció de colesterol sumat a la disminució de la producció de coprostanol i colestanol, podria explicar-se també per l'acció que els components fenòlics no absorbits de la magrana puguin tenir sobre els microorganismes que s'encarreguen de la transformació de colesterol a coprostanol i colestanol, tal com ho ha vist Nakamura et al. (2001) en un estudi portat a terme amb rates a les que es va administrar una font de components fenòlics derivats del te. Molts components del te, com les proantocianidines, i com passa amb els components fenòlics de la magrana, són escassament absorbits a l'intestí prim i la seva presència en el lumen intestinal pot tenir efectes sobre el metabolisme dels esterols.

No s'ha detectat presència de colestanona en femta, ni abans ni després de la intervenció, això podria ser degut a que aquest component es forma inicialment a partir del colesterol per acció de les bacteries de l'espècie *azotobacter*, i posteriorment aquest és transformat a coprostanol per els bacteris de les espècies *bacteroides* (García et al. 2012; García et al. 2013), per tant, podria ser que la colestanona que s'hagués format, hagués estat convertida a coprostanol, comportant l'absència de colestanona i una elevada concentració de coprostanol en femta.

Els canvis en les concentracions dels àcids biliars concorden amb un estudi realitzat per Sembries et al. (2006), en que es va administrar suc de poma, raïm i remolatxa vermella a rates, i es va determinar un increment en la concentració d'àcid còlic i d'àcid quenodesoxicòlic i una disminució en la concentració d'àcid desoxicòlic i d'àcid litocòlic. Aquests canvis poden explicar-se per el rol que

tenen els polifenols presents en el suc de magrana, ja que aquests components són capaços de modificar la microbiota, suprimint així la conversió d'àcids biliars primaris a àcids biliars secundaris (Han et al. 2009). Aquest fet comporta que hi hagi un increment en la concentració dels àcids biliars primaris, ja que no es converteixen a àcids biliars secundaris, i per tant, causa una disminució d'aquests.

La variabilitat en les concentracions entre els individus participants en l'estudi (dades no mostrades), pot esser explicada per els hàbits alimentaris d'aquests (Ruiz et al. 2010), que tot i que no es va tenir en compte, ja que només es buscava un canvi en les concentracions com a conseqüència de la ingesta del suc de magrana, és un factor clau en el desenvolupament de la flora bacteriana.

6. CONCLUSIONS

El suc de magrana utilitzat en l'estudi presentava major quantitat de components fenòlics que altres suc de fruita de consum habitual a Espanya, per tant, la ingesta de 200 mL/dia va contribuir de forma considerable a l'aport diari de components fenòlics.

La ingesta de suc de magrana ha comportat un increment en la concentració fecal d'àcid acètic, d'àcid propiònic i d'àcid butíric, això ens indica que pot contribuir a millorar la salut de la mucosa del còlon.

La intervenció també ha provocat un increment significatiu en la concentració de colesterol en femta, per tant els components fenòlics presents en el suc de magrana podrien afectar l'absorció intestinal de colesterol, i per tant, podrien influir en la concentració plasmàtica d'aquest. Per altra banda, ha produït una disminució de les concentracions de colestanol i coprostanol, aquest fet pot disminuir el risc de tumors intestinals. Però, la ingesta de suc de magrana no ha provocat canvis en la concentració de colestanona.

En el cas dels àcids biliars, després de la ingesta de suc de magrana s'ha pogut observar un increment de les concentracions dels àcids biliars primaris i una disminució de les concentracions dels àcids biliars secundaris, per tant, pot contribuir a una disminució del risc de patir patologies intestinals.

Tot i que s'han detectat modificacions en les concentracions dels components analitzats, a excepció de la colestanona, la ingesta de suc de magrana no ha estat suficient per poder veure canvis significatius en les concentracions d'AGCC, coprostanol, colestanol i d'àcids biliars. Aquests resultats poden ser a causa de que el període d'intervenció ha estat molt curt per poder arribar a determinar canvis importants i el nombre de participants ha estat reduït. A més, en el present estudi s'ha administrat suc, per tant, estava absent de fibra, la qual també té un paper molt important en la modificació de la microbiota (Cuervo et al. 2013).

El fet de que l'estudi s'hagi realitzat amb individus sans, també podria ser un motiu per el qual no s'observen molts canvis significatius en els paràmetres avaluats en aquest estudi. Si l'organisme funciona correctament no és

necessari modificar la homeòstasi. De totes maneres, s'ha observat que el consum diari de 200 mL/dia de suc de magrana aporta avantatges associats, com la disminució de la producció de substàncies potencialment tòxiques en el tracte intestinal.

Hi ha molta variabilitat entre les concentracions dels components analitzats en els diferents individus, el que indica que hi ha molts factors, entre els que es troba la dieta, que comporten canvis en la microbiota intestinal.

Hi ha molt pocs estudis amb humans en que s'analitzin canvis de concentracions dels components analitzats en aquest estudi. I també són escassos els estudis amb animals en que s'analitzen les concentracions de colestanona, coprostanol i colestanol en femta.

7. BIBLIOGRAFIA

Aprikian, O.; Duclos, V.; Guyot, S.; Besson, C.; Manach, C.; Bernalier, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Demigné, C. Apple pectin and a polyphenol-rich apple concentrate are more effective together than separately on cecal fermentations and plasma lipids in rats. *The Journal of Nutrition*. 2003;133(6):1860-1865.

Bialonska, D.; Ramnani, P.; Kasimsetty, S.G.; Muntha, K.R.; Gibson, G.R.; Ferreira, D. The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota. *International Journal of Food Microbiology*. 2010;140(2-3):175-182.

Cuervo, A.; Salazar, N.; Ruas-Madiedo, P.; Gueimonde, M.; González, S. Fiber from a regular diet is directly associated with fecal short-chain fatty acids concentrations in the elderly. *Nutrition Research*. 2013;33(10):811-816.

Cuff, M.A.; Lambert, D.W.; Shirazi-beechey, S.P. Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1. *Journal of Physiology*. 2001;539(2):361-371.

Faried, A.; Faried, L.S.; Hashimoto, S.; Tsuboi, K.; Asao, T.; Kuwano, H.; Yazawa, S. Evaluation of novel glycoconjugate molecules as promising anti-cancer agents. *Angiogenesis in Cancer and Vascular Disease* 2006;17(38):103-104.

García E. Papel central de los citocromos P450 en el catabolismo del colesterol y su regulación en mitocondrias. Tesis Doctoral. *Universidad Complutense de Madrid*. Madrid 2013.

García, J.L.; Uhía, I.; Galán, B. Catabolism and biotechnological applications of cholesterol degradation in bacteria. *Microbial Biotechnology*. 2012;5(6):679-699.

Gil, M.I.; Tomás-Barberán, F.A.; Hess-Pierce, B.; Holcroft, D.M.; Kader, A.A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000;48(10):4581-4589.

Gorena, T.; Sepú, E.; Sáenz, C. Compuestos bioactivos y actividad antioxidante de Frutos de granado (*Punica granatum* L.). *La alimentación latinoamericana* 2010;285:48-52.

Haenen, D.; Zhang, J.; Souza da Silva, C.; Bosch, G.; Van der Meer, I.M.; Van , Arkel, J.; Van den Borne, J. J. G. C.; Pérez, O.; Smidt, H.; Kemp, B.; Müller, M.; Hooilveld, G. J. E. J. A Diet High in Resistant Starch Modulates Microbiota Composition, SCFA Concentrations, and Gene Expression in Pig Intestine¹⁻³. *The Journal of Nutrition*. 2013;143:274-283.

Han, Y.; Haraguchi, T.; Iwanaga, S.; Tomotake, H.; Okazaki, Y.; Mineo, S.; Moriyama, A.; Inoue, J.; Kato, N. Consumption of some polyphenols reduces fecal deoxycholic acid and lithocholic acid, the secondary bile acids of risk factors of colon cancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57(18):8587-8590.

Henningsson, A.; Björck, I.; Nyman, M. Short-chain acid formation at fermentation of indigestible carbohydrates. *Scandinavian Journal of Nutrition*. 2001;45:165-168.

Huda-Faujan, N.; Abdulmir, A.S.; Fatimah, A.B.; Anas, O.M.; Shuhaimi, M.; Yazid, A.M.; Loong, Y.Y. The impact of the Level of the Intestinal Short Chain Fatty Acids in inflammatory Bowel Disease Patients Versus Healthy Subjects. *The open Biochemistry Journal*. 2010; (4):53-58.

Lucarelli C. Perfil de Ácidos Biliares. Dpto de Química clínica. *IACA Laboratorios*. 2010;42(2003):2961.

Martínez, A. Esteroles. Tesis Doctoral. *Universidad de Antioquia*. Medellín 2002.

Mastromarino, A.; Bandaru, P.D.; Reddy, S.; D.V.M.; Ph, D.; Wynder, E.L.; M.D. Metabolic epidemiology of colon cancer: enzymic activity of fecal flora. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1976;29:1455-1560.

Melo, V.; Cuamatzi, O. Bioquímica de los Procesos Metabólicos. 2nd ed. Barcelona: Editorial Reverte; 2007.

Mitsou, E.K.; Kougia, E.; Nomikos, T.; Yannakoulia, M.; Mountzouris, K.C.; Kyriacou, A. Effect of banana consumption on faecal microbiota: a randomised, controlled trial. *Anaerobe*. 2011;17(6):384-387.

Nakamura, Y.; Kaihara, A.; Yoshii, K.; Tsumura, Y.; Ishimitsu, S. Effects of the oral administration of green tea polyphenol and tannic acid on serum and hepatic lipid contents and fecal steroid excretion in rats. *Journal of Health Science*. 2001;(47):107-117

Osada, K.; Suzuki, T.; Kawakami, Y.; Senda, M.; Kasai, A.; Sami, M.; Ohta, Y.; Kanda, T.; Ikeda, M. Dose-dependent hypocholesterolemic actions of dietary apple polyphenol in rats fed cholesterol. *Lipids*. 2006;41(2):133-139.

Panda, S.K.; Chatteraj, S.C.; Broitman, S.A. Correlation of neomycin, fecal neutral and acids sterols with colon carcinogenesis in rats. *British Journal of Cancer*. 1999;80(8):1132-1136.

Proteggente, A.R.; Pannala, A.S.; Paganga, G.; Van Buren, L.; Wagner, E.; Wiseman, S.; Van de Put, F.; Dacombe, C.; Rice-Evans, C.A. The Antioxidant Activity of Regularly Consumed Fruit and Vegetables Reflects their Phenolic and Vitamin C Composition. *Free Radical Research*. 2002;36(2):217-233.

Ridlon, J.; Kang, D.J.; Hylemon, P. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of Lipid Research*. 2006;47(2):241-259.

Ruiz, V.; Puig, Y.; Rodríguez, M. Microbiota intestinal, sistema inmune y obesidad. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 2010;29(3):364-397.

Scheppach, W. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut* 1994; 35(1):35–38.

Schnäbele, K.; Briviba, K.; Bub, A.; Roser, S.; Pool-Zobel, B.L.; Bechkemmer, G. Effects of carrot and tomato juice consumption on faecal markers relevant to colon carcinogenesis in humans. *British Journal of Nutrition*. 2008;99(3):606-613.

Seeram NP, Suchulman RN, Heber D. Pomegranates. Ancient Roots to Modern Medicine. Medicinal and Aromatic Plants—Industrial Profiles 43. Boca Raton, Fla.: CRC/Taylor & Francis, 2006.

Sembires, S.; Dongwski, G.; Mehrländer, K.; Will, F.; Dietrich, H. Physicological effects of extraction juices from apple, grape and red beet pomaces in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54(26):10269-10280.

Sugiyama, H.; Akazome, Y.; Shoji, T.; Yamaguchi, A.; Yasue, M.; Kanda, T.; Othake, Y. Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreàtic lipase and triglyceride absorption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55(11):4604-4609.

Voet, D.; Voet, J.G.; Pratt, C.W. Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. 2nd ed. Distrito Federal: Editorial Médica Panamericana, 2006.